

**PEPTIDE HAVING BINDING ABILITY TO LUCIFERASE****Patent number:** JP2002187899**Publication date:** 2002-07-05**Inventor:** NOMOTO TAKESHI**Applicant:** CANON KK**Classification:**

**- international:** G01N33/53; C07K7/06; C07K7/08; C12Q1/66;  
G01N33/566; G01N33/53; C07K7/00; C12Q1/66;  
G01N33/566; (IPC1-7): C07K7/08; C07K7/06;  
C12Q1/66; G01N33/53; G01N33/566

**- european:****Application number:** JP20000385761 20001219**Priority number(s):** JP20000385761 20001219

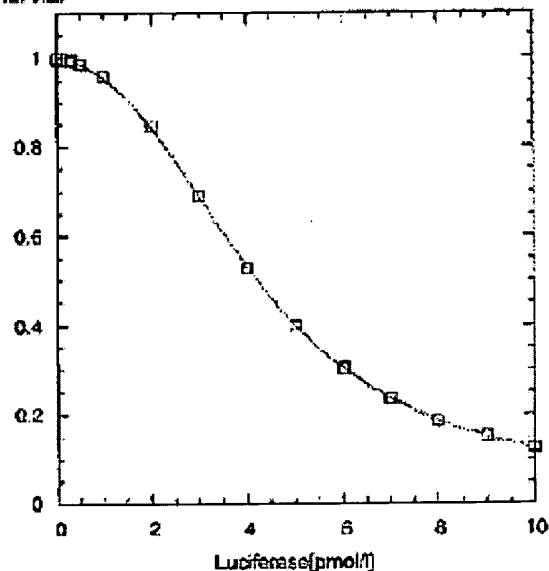
Report a data error here

**Abstract of JP2002187899**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a peptide having binding ability to luciferase and capable of being used for directly quantitating the luciferase. **SOLUTION:** This peptide having binding ability to the luciferase is composed of a peptide chain comprising the whole sequence or a partial sequence of at least one kind of an amino acid sequence selected from 8 kinds of amino acid sequences such as an amino acid sequence represented by the following: Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp and the luciferase-binding peptide enables to detect the luciferase with high quantitative accuracy by using a method such as a competition method.

**競合法による定量曲線**

蛍光強度(相対値)



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-187899

(P2002-187899A)

(43) 公開日 平成14年7月5日(2002.7.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
C 0 7 K 7/08	Z N A	C 0 7 K 7/08	4 B 0 6 3
		7/06	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/66		C 1 2 Q 1/66	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
33/566		33/566	
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 14 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-385761(P2000-385761)

(22) 出願日 平成12年12月19日(2000. 12. 19)

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 野本 毅

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ22

QR48 QR66 QS03 QS32 QS33

QS34 QX02

4H045 AA10 AA30 BA14 BA16 EA50

FA34 FA40 GA05 GA15

(54) 【発明の名称】 ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド

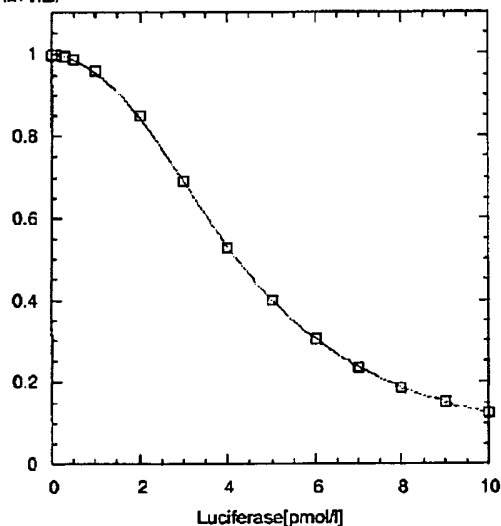
## (57) 【要約】

【課題】 ルシフェラーゼの直接定量に利用可能な、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドの提供。

【解決手段】 下記のアミノ酸配列：Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trpなど合計8種のアミノ酸配列から選択する少なくとも一種のアミノ酸配列の全部またはその部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドであり、このルシフェラーゼ結合性ペプチドは、競合法などの手法を利用して、ルシフェラーゼを高い定量性で検出することを可能とする。

## 競合法による定量曲線

蛍光強度(相対値)



- 【特許請求の範囲】 酸配列の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- 【請求項1】 以下の8種類のアミノ酸配列(I)～(VII)からなる群から選択される少なくとも1種類のアミノ酸配列の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)  
 Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)  
 Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)  
 Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)  
 Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)  
 Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)  
 Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)  
 Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)
- 【請求項2】 下記のアミノ酸配列(I)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)
- 【請求項3】 下記のアミノ酸配列(II)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)
- 【請求項4】 下記のアミノ酸配列(III)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)
- 【請求項5】 下記のアミノ酸配列(IV)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)
- 【請求項6】 下記のアミノ酸配列(V)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)
- 【請求項7】 下記のアミノ酸配列(VI)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)
- 【請求項8】 下記のアミノ酸配列(VII)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)
- 【請求項9】 下記のアミノ酸配列(VIII)の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)
- 【請求項10】 ルシフェラーゼの検出手段として、以下の8種類のアミノ酸配列(I)～(VIII)からなる群から選択される少なくとも1種類のアミノ酸配列の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドを具備するルシフェラーゼ検出キット。
- Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)  
 Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)  
 Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)  
 Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)  
 Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)  
 Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)  
 Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)  
 Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)
- 【請求項11】 以下の8種類のアミノ酸配列(I)～(VII)からなる群から選択される少なくとも1種類のアミノ酸配列の全部、または、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなり、全アミノ酸長が30以下のペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド。
- Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)  
 Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)  
 Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)

Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)  
 Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)  
 Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)  
 Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)  
 Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)

# 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ルシフェラーゼに対して結合性を有するアミノ配列を含むペプチド、ならびに、前記ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドを検出手段として利用するルシフェラーゼ検出キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術】ルシフェラーゼは生物発光を触媒するオキシゲナーゼの総称であり、発光酵素ともいわれている。この酵素は、酸素分子によるルシフェリンの酸化を触媒し、その際の化学変化に伴い、基質ルシフェリンに由来する化学発光が得られる。なお、その反応機構は、ルシフェラーゼが起源とする種によって異なることが知られている。なかでも、ホタルから分離されたルシフェラーゼによる生物発光反応は、最もよく研究されている。ホタル・ルシフェラーゼ (EC.1.13.12.7) はアデノシン三リン酸 (ATP) とホタル・ルシフェリンに代表されるルシフェラーゼ基質に作用し、アデノシン三リン酸 (AMP) とオキシルシフェリンを生成すると同時に発光を生じる。

【0003】ルシフェラーゼによる生物発光反応は、ペルオキシダーゼを使った化学発光と比較し感度の点で有利なため、分析手法としては非常に有用性が高い。ルシフェラーゼの最も代表的な利用分野は、分析用試薬としての利用である。分析用試薬としての具体的な例として、第一に、ルシフェラーゼを標識物質として用いた各種結合分析系が挙げられる。結合分析系には、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法、相補的核酸の親和性を利用した核酸ハイブリダイゼーション・アッセイ法、その他にアビジン・ビオチン、ホルモン・ホルモン受容体、糖・レクチンというような特異的な親和性を備えた物質同士の結合を利用した分析系等が知られている。これらの結合分析系において、ルシフェラーゼを標識物質 (標識酵素) として利用すれば、その酵素活性を測定することにより、結合分析系において、最終的に結合した (あるいは、結合しなかった) 物質の量を追跡することが可能になる。

【0004】ルシフェラーゼによる生物発光反応の利用には、この他に、ルシフェラーゼ自体やその酵素反応に利用される ATP を検出する手段としての用途も考えられる。例えば、ルシフェラーゼ遺伝子を指標とする外来遺伝子のスクリーニングや、遺伝子変異の分析にあたっては、産生されるルシフェラーゼの活性の追跡が必要となる。

【0005】また、ホタル・ルシフェラーゼを用いた ATP の検出法は、細胞数の測定や、酵素反応生成物としての ATP を指標とする酵素反応の追跡や、ATP 自体を標識として用いた結合分析系に利用されている。より具体的には、系内に含有する ATP 濃度を測定することにより、水、食品、化粧品などに含まれる微生物数の間接的な測定法、血球・精子などの細胞組織の活性測定法、薬物等のストレスの影響度測定への応用が可能であることが、報告されている。

【0006】一方、ルシフェラーゼ自体の定量は、その機能、酵素活性に基づいてなされることが一般的である。特開平07-069899号公報には、ルシフェラーゼ濃度の常用対数とその酵素活性 (蛍光の積算値) の常用対数とが1次関数として直線に乗ることから、これを検量線として、ルシフェラーゼの定量が可能であることが開示されている。例えば、感染細胞中に発現されたルシフェラーゼについて、活性値 (蛍光の積算値) を測定し、その蛋白量を前記の検量線に基づき求めている。

【0007】また、特開平08-116991号公報では、発光量が一定条件下では加えたルシフェラーゼ量に依存することを利用して、トランス・ジェニック線虫の虫体に含まれるルシフェラーゼ量を、その細胞抽出液における発光量の増加として測定している。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】ルシフェラーゼを、その酵素活性 (発光量) に基づき定量する方法では、検量線作成の条件と試料測定の条件を同一にすることを前提としている。しかしながら、例えば、組織換え体のように、in vivoでルシフェラーゼ量を定量しようとする場合、多くの場合、この前提条件を保証することは困難である。加えて、ホタル等の生物材料から抽出したルシフェラーゼは、その安定性に問題があり、経時的にその酵素活性が減少するため、発光量に基づく機能的定量方法を用いる際には、その測定データの信頼性に自ずから限界がある。

【0009】そのため、その酵素活性 (発光量) に基づき定量する方法に代えて、ルシフェラーゼを定量する方法、より具体的には、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドを検出手段として利用するルシフェラーゼの定量方法の提案が望まれている。

【0010】本発明は前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、ルシフェラーゼの直接定量に利用可能な、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドの提供と、かかるルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドを検出手段として利用する、ルシフェラーゼの

検出方法、それに専ら利用される検出キットを提供することにある。なお、本発明の目的とする、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドは、試料中のルシフェラーゼの直接的な定量のみならず、ルシフェラーゼを分離・精製する際にも有用な手段となる。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決すべく、ルシフェラーゼに対して特異的な結合性を有するペプチドを、ランダム・ペプチド・ライブラリーからスクリーニングを進めたところ、合計8種のペプチドが、十分に高い結合能を有することを見出した。それらの8種のペプチドについて、そのアミノ酸配列を解析するとともに、それぞれルシフェラーゼに対する結合性に関与すると考えられるペプチド鎖を特定した。具体的には、以下に示す(I)～(VIII)のペプチド鎖が、ルシフェラーゼに対する高い結合性を有することが判明した。

ペプチド(I) : Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp

ペプチド(II) : Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln

Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)  
Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)  
Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)  
Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)  
Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)  
Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)  
Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)  
Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)

【0013】例えば、本発明のルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドは、それぞれ、下記のアミノ酸

Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチド、下記のアミノ酸配列

Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチド、下記のアミノ酸配列

Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチド、下記のアミノ酸配列

Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチド、下記のアミノ酸配列(V) :

Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチド、下記のアミノ酸配列(VI) :

Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んで

ペプチド(III) : Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro

ペプチド(IV) : Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala

ペプチド(V) : Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser

ペプチド(VI) : Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile

ペプチド(VII) : Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg

ペプチド(VIII) : Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys

解析されたアミノ酸配列を相互に対比させたところ、ペプチド(I)～(VIII)の何れの間でも有意な相同性を有しておらず、また、ルシフェラーゼに対する特異的な結合性は、それぞれのアミノ酸配列に含まれる部分配列によって達成されていると判断された。本発明者は、かかる知見に基づき、本発明を完成するに至った。それぞれ異なるアミノ酸配列を有する。

【0012】すなわち、本発明のルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドは、以下の8種類のアミノ酸配列(I)～(VIII)からなる群から選択される少なくとも1種類のアミノ酸配列の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドである。

配列(I) :

Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)

(II) :

Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)

(III) :

Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)

(IV) :

Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)

なるペプチド鎖からなるペプチド、下記のアミノ酸配列(VII) :

Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチド、あるいは、下記のアミノ酸配列(VIII) :

Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)

の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなるペプチドとすることができる。

【0014】加えて、本発明は、上記のルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドをルシフェラーゼの検出に利用する方法をも提供し、この検出方法に利用されるキットを併せて提供する。すなわち、本発明のルシフェラーゼ検出キットは、ルシフェラーゼの検出手段として、以下の8種類のアミノ酸配列(I)～(VIII)からなる

Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp	(I)
Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln	(II)
Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro	(III)
Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala	(IV)
Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser	(V)
Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile	(VI)
Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg	(VII)
Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys	(VIII)

【0015】なお、本発明によるペプチドの構成に参加するアミノ酸残基を命名するために、ヌクレイック・アシッド・リサーチ (NUCLEIC ACIDS RESEARCH) 13, 3021-3030 (1985) 及びザ・バイオロジカル・ジャーナル (THE BIOLOGICAL JOURNAL) 219, No.2, 345-371 (1984) に表される IUPAC-IUB規則(Rules)が用いられる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下に、本発明のルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチド、その調製方法、さらには、本発明のルシフェラーゼ検出キットにおけるルシフェラーゼ結合性ペプチドの使用法に関して、より詳しく説明する。

【0017】本発明のルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドは、少なくとも、上記8種類のアミノ酸配列(I)～(VIII)の何れか、あるいは、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含むペプチド鎖から構成されている。すなわち、前記のルシフェラーゼに対する結合性を発揮するアミノ酸配列を、少なくとも、それを構成するペプチド鎖の一部に含有するペプチドとして、存在してもよい。そのような、前記のルシフェラーゼに対する結合性を発揮するアミノ酸配列をその部分配列として含有するペプチド鎖とする際、残余するアミノ酸配列は、ルシフェラーゼに対する結合性を阻害しない限り、如何なるアミノ酸配列を採用してもよい。

【0018】本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチドは、その全アミノ酸配列に従って、公知の有機化学的ペプチド合成方法のいずれかで、または組み換えDNA技術を用いて調製できる。

【0019】有機化学的ペプチド合成方法は、必要なアミノ酸同士を均質相中で、またはいわゆる固相を用いて縮合反応により結合させることを含む。

【0020】ペプチド鎖の伸長を行う際に利用する縮合反応は、

a) 遊離カルボキシル基を有し、その他の反応性基は保護されている化合物(アミノ酸、ペプチド)を、遊離アミノ基を有し、その他の反応性基は保護されている化合

群から選択される少なくとも1種類のアミノ酸配列の全部またはそのアミノ酸長5以上の部分配列を含んでなるペプチド鎖からなる、ルシフェラーゼに対して結合性を有するペプチドを具えてなるルシフェラーゼ検出キットである。

物(アミノ酸、ペプチド)と、縮合剤存在下に縮合させる、または

b) 活性化されたカルボキシル基を有し、その他の反応性基は遊離であるか、または保護されている化合物(アミノ酸、ペプチド)を、遊離アミノ基を有し、その他の反応性基は遊離であるか、または保護されている化合物(アミノ酸、ペプチド)と縮合させる、前記のa)またはb)の手法を用いることによって実施し得る。

【0021】前記のb)の手法において、カルボキシル基の活性化は、特に、カルボキシル基を酸ハロゲン化物、アジド、酸無水物、イミダゾリド、またはN-ヒドロキシースクシンイミド、N-ヒドロキシーベンゾトリアゾールもしくはp-ニトロフェニルエステルなどの活性化エステルに変換することによって行なう。

【0022】なかでも、上記縮合反応を生起させる最も普通の方法は、カルボジイミド法、アジド法、混合酸無水物法、ならびに、E. Gross及びJ. Meienhofer編、The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vols. 1-3, Academic Press Inc., 1979, 1980, 1981に記載されているような活性化エステルを用いる方法である。

【0023】本発明による上述のペプチドの適当なフラグメントを「固相法」を用いて調製する際、利用できるペプチド合成方法は、例えば、J. Amer. Chem. Soc. 85, p. 2149, 1963及びInt. J. Peptide Protein Res. 35, pp. 161-214, 1990に記載されている。この「固相法」においては、調製すべきペプチドのアミノ酸の結合(ペプチド鎖の伸長)は、普通、カルボキシル末端側から始まる。その際、この「固相法」による合成方法では、反応性基を担持するか、またはその上に反応性基が導入され得る固相が必要である。固相には、例えば、ベンゼン及びジビニルベンゼンと反応性クロロメチル基とのコポリマーか、またはヒドロキシメチルもしくはアミン官能基と反応する性質を付与さ

れたポリマー固相が利用できる。特に適当な固相は、例えば、J. Am. Chem. Soc. 95, p. 1328, 1974にWangが述べているp-アルコキシベンジルアルコール樹脂(4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル-コポリスチレン-1%ジビニルベンゼン樹脂)である。

【0024】一連の合成(ペプチド鎖の伸長)後、ペプチドは上記固相から穏和条件下に分離され得る。具体的には、所望のアミノ酸配列の合成後、続いて固相とした樹脂からペプチドを、例えば、トリフルオロメタンスルホン酸、またはトリフルオロ酢酸に溶解させたメタンスルホン酸で分離する。あるいは、ペプチドは、低級アルコール、好ましくはメタノールまたはエタノールを用いるエステル交換反応によっても支持体から分離でき、この場合、分離されたペプチドは、低級アルキルエステルの形態となる。同様に、アンモニアを用いて、ペプチドの分離を図ることもでき、その際には、分離されたペプチドは、そのC末端はアミドの形態となったものとなる。

【0025】上記の縮合反応(ペプチド鎖の伸長)に関与しない反応性基、具体的にはアミノ酸残基上の反応性基とペプチド鎖のN末端のアミノ基は、先に述べたように、酸、塩基を用いる加水分解または還元によってきわめて容易に再度除去することができる基によって有効に保護する。例えば、カルボキシル基であれば、例えばメタノール、エタノール、t-ブタノール、ベンジルアルコールまたはp-ニトロベンジルアルコールとのエステル化、及び固体支持体に結合したアミンによって有効に保護し得る。一方、アミノ基を有効に保護し得る基は、エトキシカルボニル、ベンジロキシカルボニル、t-ブトキシカルボニル(t-boc)もしくはp-メトキシベンジロキシカルボニル基であるか、またはベンゼンスルホニルもしくはp-トルエンスルホニル基などの、スルホン酸に由来する酸基であるが、置換または非置換アリールまたはアルキル基、例えばベンジル及びトリフェニルメチルや、オルト-ニトロフェニル-スルフェニル及び2-ベンゾイル-1-メチル-ビニルなどの基のような他の基を用いることも可能である。特に、適当な $\alpha$ -アミノ保護基は、例えば、塩基感受性の9-フルオレニル-メトキシカルボニル(Fmoc)基(Carpino及びHan, J. Amer. Chem. Soc. 92, p. 5748, 1970)である。

【0026】なお、ペプチド合成において用い得る保護基についてのより広範な記述が、Gross, Udenfriend及びMeienhofer編, The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vols. 1-9, Academic Press Inc., 1979-1987中に見出され得る。

【0027】例えば、 $\alpha$ -アミノ基に加えて、リシンの $\epsilon$ -アミノ基を保護することも必要であり、またアルギニンのグアニジン基は保護することが適当である。このような保護に通常用いられる保護基は、リシンの場合はBoc基、アルギニンの場合はPmc基、Pms基、Mbs基またはMtr基である。

【0028】これらの保護基は、当該基の性質に応じて様々な通常方法で、例えば、トリフルオロ酢酸を用いて、または水素とパラジウムなどの触媒とを用いる穏和な還元によって、または水酢酸中のHBrを用いて除去可能である。

【0029】本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチドは、ルシフェラーゼとの結合性を有するアミノ酸配列をその内部に複数含むように組み合わせて、一連のアミノ酸配列とした、1個の分子とすることもできる。この二個以上の部分ペプチド鎖が共有結合により連結されたものに相当する、混成ペプチドまたは複合ペプチドとすることは、例えば、先に述べた方法を用いて、目的とする一連のアミノ酸配列に従って、固相ペプチド合成することにより可能である。その際、個々の部分ペプチド鎖に相当するアミノ酸配列は、互いに整列させる。なお、個々の部分ペプチド鎖に相当するアミノ酸配列間には、リンカー配列を挿入することもできる。そのようなリンカー配列は、例えば、グリシンの2~5残基の伸長部(stretch)を利用することもできる。

【0030】さらには、混成または複合ペプチドは、フラグメント縮合技術を用いる固相合成によっても調製可能である。予め、そのアミノ酸配列が上記(I)~(VIII)のアミノ酸配列の何れかを含むフラグメント(部分ペプチド鎖)を含め、それぞれ所定のアミノ酸配列を有する複数のフラグメントを、個別に調製及び精製する。その後、前記フラグメント(部分ペプチド鎖)を縮合させて、目的とする一連のアミノ酸配列を有する全体ペプチドに構成する。このフラグメント縮合の手法は、比較的長い混成または複合ペプチド配列を合成する場合に好ましい。比較的長いペプチドを調製する方法は、当業者には公知であり、例えば、The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vols. 1-9(上記参照)に記載されている。

【0031】あるいは、上述する一連の長いペプチド鎖に構成する以外に、本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドは、適宜修飾した本発明のペプチド鎖同士を結合させることによって混成または複合ペプチドを調製することもできる。

【0032】例えば、結合させようとするペプチド鎖自体は、そのアミノ酸配列中にシステインアミノ酸を含んでいない場合、この2個の異なるペプチド鎖を結合させる好ましい方法の一つは、各ペプチド鎖を、そのカルボキシル末端かまたはアミノ末端に付加的なシステイン残



基を有する誘導体に変換し、その付加的なシステイン残基間でジスルフィド結合を形成させる手法である。このジスルフィド結合を形成させる方法では、末端にシステイン残基を有する誘導体に変換した後、一方のペプチド誘導体に対して、導入された末端の単一システインのチオール官能基を、2, 2'-ジチオジピリジンで活性化する。得られたピリジールジチオペプチド誘導体を、システインチオール基を有する第二のペプチド誘導体と反応させて、個別のペプチド鎖がジスルフィド結合によって連結された混成ペプチドを得る。

【0033】他の、種々の混成ペプチド調製方法も利用可能である。例えば、タンパク質-タンパク質結合の分野で開発された化学的方法も用いることができる。このようなペプチド鎖間のリンキングの手法については、Means及びFeeney (Bioconj. Chem. 1, pp. 2-12, 1990)を参照されたい。例えば、良く知られたホモまたはヘテロ二官能架橋剤を用いれば、個々のペプチド鎖間を、ジスルフィド結合、またはチオエーテル結合、またはアミド結合等で結合させることができる。

【0034】合成の後、すべての保護基が除去され、固体の担体から放出された粗製の生成物は、一旦凍結乾燥する。次いで、粗製の生成物は、約70%の純度のペプチドを得るために、中圧の液体クロマトグラフィーにより精製される。粗精製された生成物は、次に高压液体クロマトグラフィー(HPLC)によるか又は他の種類のクロマトグラフィーにより精製され、分析用HPLCによる純度検定において、95%の純度のペプチドが得られる。

【0035】先に触れたように、本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチドは、組み換えDNA技術を用いても調製し得る。この組み換えDNA技術の利用可能性は、目的とするアミノ酸配列の部分ペプチド鎖を反復配列中に「タンデムに」組み込む場合、または部分ペプチド鎖を、全体アミノ酸長がはるかに大きいタンパク質またはポリペプチド中の構成要素として、もしくは、汎用の融合パートナー、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(の一部)との融合タンパク質として調製し得る場合、あるいは、別種の抗体中の超可変領域のアミノ酸配列と置き換えて組換え型の人工的な抗体を創製する場合に、特に重要である。従って、上記のように、主体部分は他のタンパク質やポリペプチドに由来し、その一部として目的のアミノ酸配列の部分ペプチド鎖が挿入、付加された形態のペプチドも本発明の技術的範囲内に含まれる。この調製方法では、組み換えDNAの構成要素として、本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチドを特徴づける、上記8種類のアミノ酸配列(I)~(VIII)の何れか、あるいは、そのアミノ酸長5以上の部分配列を含む部分ペプチド鎖をコードする核酸配列を用いる。

【0036】上記組み換えDNA技術を用いる方法は、

宿主として適当な微生物において、調製したい1種以上のルシフェラーゼ結合性ペプチド鎖部分をコードする核酸配列を含む組み換えポリヌクレオチドを発現させることにより所望のペプチドを調製することを含む。

【0037】本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチド鎖部分をコードする核酸配列は、その塩基配列を有するDNA断片として、汎用されるプラスミドなど中に挿入し、かかるプラスミドなどに備わる様々な複製実現DNA配列と連結させて、いわゆる組み換えベクター分子とすることができる。この組み換えベクター分子は適当な宿主の形質転換に用い得る。有用な組み換えベクター分子は、好ましくは、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、コスミドまたはウイルスに由来する。

【0038】目的とする核酸配列のクローニングに用い得る特異的ベクターまたはクローニングビヒクルは、当業者に公知であり、特にpBR322、様々なpUC、pGEMおよびBluescriptプラスミドなどのプラスミドベクター、バクテリオファージ、例えば、kg-t-Wes、Charon 28及びM13由来ファージ、さらには、SV40、アデノウイルスもしくはポリオマウイルスなどのウイルスベクターをも含む(R. L. Rodriguez及びD. T. Denhardt編, Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworths, 1988; J. A. Lenstra等, Arch. Virol. 110, pp. 1-24, 1990も参照されたい)。組み換えベクター分子の構築に用いるべき手法は、当業者に公知であり、特にT. Maniatis等が提示している(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)。

【0039】例えば、本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチド鎖部分をペプチドをコードする核酸配列(DNA断片)をクローニングベクター中に挿入することは、挿入する遺伝子(DNA)の両端を、必要に応じて、一種以上の制限酵素を利用して切断し、また、所望のクローニングビヒクルのクローニング部位(サイト)も同じ制限酵素によって消化して、両者を互いに連結すべき端部に、それぞれ相補的DNA末端を形成されることにより、挿入・連結が容易に実施可能となる。

【0040】なお、組み換えベクター分子は、pBR322のアンピシリン及びテトラサイクリン耐性、並びにpUC8のアンピシリン耐性及び $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ -ペプチドをコードする領域の活性のような、所望の形質転換体の選択に用い得る1種以上のマーカー活性(遺伝子)を付加的に有していてもよい。

【0041】本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチ

ドは、ルシフェラーゼ結合性を与えるアミノ酸配列を維持する限り、そのペプチド鎖上には、例えば、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化またはリン酸化により、*in vivo*または*in vitro*で修飾することも可能である。従って、本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチドは、例えば、酸付加塩、アミド、エステル、特にC末端エステル、及びN-アシル誘導体などの機能性修飾体とした例も本発明の一部として含有される。

【0042】本発明によるルシフェラーゼ結合性ペプチドにおいても、例えば、前記のように天然のタンパク質やポリペプチドの構成要素として、目的のアミノ酸配列を有する部分ペプチド鎖が含まれる場合など、その全体のペプチド鎖中には自然の改変が存在することも有り得ると理解される。そのような改変は、全アミノ酸配列の中にみられる、一つ以上のアミノ酸の相違（置換）によって、または1個以上のアミノ酸の欠失、挿入によって明示され得る。なお、天然のタンパク質やポリペプチドにおいて、その生物活性及び免疫活性を実質的に変更しないと考えられるアミノ酸置換がこれまで幾種類も開示されている。より具体的には、関連するアミノ酸間でのアミノ酸置換、もしくは進化の過程でしばしば生じた置換として、代表的なものは、例えば、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valである（M. D. Dayhof, "Atlas of protein sequence and structure," Nat. Biomed. Res. Found., vol. 5, suppl. 3, Washington D. C., 1978 参照）。例えば、この情報に基づき、Lipman及びPearsonは、迅速かつ高感度のタンパク質比較法を開発し（*Science* 227, pp. 1434-1441, 1985）、相同タンパク質同士の機能類似度を測定している。本発明においても、そのルシフェラーゼ結合性を損なわない限り、前記の自然界においても、高い頻度で見出される変異を含むことができる。

【0043】本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドは、比較的短いペプチド鎖にも関わらず、ルシフェラーゼに対する特異的な結合性を有しており、従って、容易に作製できる上、プローブとして例えば基板上への固定が容易であるといった利点を持つ。このルシフェラーゼ結合性ペプチドを支持体に担持して、ルシフェラーゼを含む試料と接触させれば、試料中に含有されるルシフェラーゼをルシフェラーゼ結合性ペプチドとの結合を介して、支持体近傍に捕捉することができる。このように、本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドは、そのアミノ酸長の上限は、特に限定はないものの、固定化プローブとして利用する際には、アミノ酸長を50以下、より好ましくはアミノ酸長30以下とすることが望ましい。すなわち、前記のアミノ酸長を超えない、より短い鎖長の

ペプチドを用いると、高密度で結合性ペプチドを支持体表面に担持することができるので、ルシフェラーゼを高密度で支持体近傍に捕捉することができる。従って、標識物質を備えた既知濃度のルシフェラーゼとの競合反応、あるいは、標識物質を備えた遊離のペプチド（標識プローブ）とのサンドイッチ反応や凝集反応を利用すれば、生物学的試料におけるインビトロでのルシフェラーゼの高感度の検出・定量に利用することができる。

【0044】本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドを担持する際に、使用できる支持体は、例えば、マイクロ試験ウエルまたはキュベットの内壁、管または細管、膜、フィルター、試験ストリップ、さらには、粒子、例えば、ラテックス粒子、アルデヒド粒子；具体的には、活性アルデヒド表面基を有するセラミック磁性粒子などの表面、色素ゾル、金属ゾルまたはゾル粒子としての金属化合物、ウシ血清アルブミンのようなキャリアタンパク質などである。一方、上記の検出・定量法において使用できる標識物質は、とりわけ、蛍光化合物、放射性同位体、標識酵素、色素ゾル、金属ゾルまたはゾル粒子としての金属化合物などである。

【0045】本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドとルシフェラーゼとの結合反応は、pH 5～9、好ましくはpH 6～7.5程度の適当な緩衝液中で、温度2～40℃、好ましくは4～10℃の条件で、通常、10分間～24時間、好ましくは30分間～60分間行うのが適当である。用いる緩衝液に、特に制限はないが、前記のpH範囲において広く利用される、例えば、濃度0.01～1 M程度、好ましくは0.1～0.5 M程度のリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液などが適当である。

【0046】支持体上に担持した本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドと、ルシフェラーゼとの結合複合体を形成せしめる反応後、および／又は形成された結合複合体と標識プローブとの反応後、反応生成物を適当な洗浄液、例えば、蒸留水、生理食塩水、リン酸緩衝液、トリトンX-100含有緩衝液又はトゥイーン20含有緩衝液などにて洗浄して、未反応物を除去する。残った結合複合体は、洗浄後、標識物に応じて、標識酵素の酵素活性、放射能、あるいは蛍光などの評価に適した測定機器、例えば、酵素反応生成物を測定する分光光度計、井戸型シンチレーションカウンター、蛍光光度計などを用いて、結合複合体に付されている標識物質の存在又はその量を測定する。

【0047】なお、上述した標識物質を備えた遊離のペプチド（標識プローブ）とのサンドイッチ反応に利用される標識プローブには、結合複合体を構成しているルシフェラーゼと選択的に結合するペプチド、すなわち、本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドが利用される。その際、結合複合体の形成に利用される支持体上に担持したルシフェラーゼ結合性ペプチドと、標識プローブに利用するルシフェラーゼ結合性ペプチドとは、相互にその

結合部位が競合することのない組み合わせを選択する。従って、前記の二種のルシフェラーゼ結合性ペプチドは、そのルシフェラーゼ結合性に関与するアミノ酸配列が互いに異なるものを選択する。

【0048】例えば、支持体上に担持されるルシフェラーゼ結合性ペプチドは、そのルシフェラーゼ結合性に関与するアミノ酸配列部分に加えて、支持体上への担持、あるいは、結合固定に利用される付加的なペプチド部分を含むものとして行うことができる。例えば、システインをN末端あるいはC末端に付加することによって、この付加されたシステイン側鎖のSH基の金表面に対する結合能を利用して、ペプチドの単分子膜を自律的に形成することもできる。一方、標識プローブに利用するルシフェラーゼ結合性ペプチドも、ルシフェラーゼ結合性に関与するアミノ酸配列部分に加えて、必要に応じて、標識物質を付す際に利用する付加的なペプチド部分を含むものとして行うことができる。

【0049】本発明のルシフェラーゼ検出キットは、先に例示した検出方法に応じて、支持体上に担持されるルシフェラーゼ結合性ペプチドと、標識物質を備える標準ルシフェラーゼ、あるいは、標識物質を備えた遊離のルシフェラーゼ結合性ペプチド（標識プローブ）とから構成されるキットとして行うことができる。

【0050】

【実施例】以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体

Lys-His-Val-Asn-Glu-Leu-Arg-Glu-Leu-Ala-Arg-Trp (I)

合成するペプチドのC末端残基に相当するアミノ酸（Trp）が導入されているFmoc-Trp-レジン樹脂（0.44 mmol/g；島津製作所（株）社製）の30 mgを上記ペプチド合成機の反応容器にセットし、ジメチルホルムアミド（以下「DMF」という）で1回洗浄した。次に、デプロテクション溶液（30%（v/v）ピペリジン/DMF）を5分間、3分間と2回反応させ、樹脂に結合しているアミノ酸（Trp）のFmoc基を除き、DMFで5回洗浄した。C末側から2番目のアミノ酸（Arg）に相当する150 μmolのFmoc-Arg(Pmc)-OH/PyBOPに、アクチベーター溶液（0.5 M 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）/DMFと1 M N-メチルモルホリン/DMF）を加えて活性化したものと、先のFmoc基を除いた樹脂に結合しているアミノ酸（Trp）を30分間室温で反応させた。ここで、未反応のFmoc-Arg(Pmc)-OH/PyBOPなどを含む反応液を除去するため、生成したFmoc-Arg(Pmc)-Trp-レジン樹脂をDMFで

的に説明する。なお、これら実施例は、本発明の最良の実施の形態の一例ではあるものの、本発明はこれら具体例に限定されるものではない。

【0051】（実施例1）上記アミノ酸配列(I)～(VII)をそれぞれ有する8種類のペプチドを化学合成し、そのルシフェラーゼに対する結合性を検証した。

【0052】ペプチドの合成

樹脂に固定したアミノ酸誘導体に、1個ずつアミノ酸をカルボキシル末端側から結合させていく方法（固相合成法）でペプチドを化学合成した。各サイクルで使用するアミノ酸は、 $\alpha$ -アミノ基およびアミノ酸残基部分（側鎖）の反応基が保護基でブロックされた特殊な $\alpha$ -アミノ酸誘導体を用いた。本実施例では、それぞれの $\alpha$ -アミノ基はFmoc基（9-フルオレニル・メチロキシカルボニル基）によりブロックされている各アミノ酸の誘導体を用いた（Fmoc法）。また、ペプチド合成（ペプチド鎖の伸長）は、樹脂に結合したアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基のFmoc基を脱保護し、次に、カルボキシル基が活性化したアミノ酸誘導体を、前記脱保護した $\alpha$ -アミノ基に結合させるという反応を、順次繰り返して行なった。各ペプチドは、ペプチド合成機（PSSM-8；島津製作所（株）社製）を用い上記のFmoc固相合成法にて合成した。

【0053】すなわち、下記のアミノ酸配列を有するペプチド(I)の合成においては、

4回洗浄した。その後、Fmoc-Arg(Pmc)-Trp-レジン樹脂について、再び、前記の条件で、そのN末Fmoc基のデプロテクションを行い、DMFで5回洗浄した後、アクチベーター溶液により活性化Fmoc-Ala-OH/PyBOP溶液と反応させた。反応終了後、未反応のFmoc-Ala-OH/PyBOPなどを含む反応液を除去するため、DMFで4回洗浄した。

【0054】以後のペプチド鎖の伸長も、同様の操作を繰り返すことにより、目的とする保護ペプチド樹脂：Fmoc-Lys(Boc)-His(Trt)-Val-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Leu-Arg(Pmc)-Glu(OtBu)-Leu-Ala-Arg(Pmc)-Trp-レジン樹脂を合成した。

【0055】なお、本実施例以下のペプチド合成に使用したアミノ酸誘導体は以下の通りである（各アミノ酸に付記する（ ）内は当該アミノ酸残基部分（側鎖）の反応基を保護する保護基を表す；島津製作所（株）社製）：

Fmoc-Ala-OH/PyBOP, Fmoc-Arg(Pmc)-OH/PyBOP, Fmoc-Asn(Trt)-OH/PyBOP,  
Fmoc-Asp(OtBu)-OH/PyBOP, Fmoc-Cys(Trt)-OH/PyBOP, Fmoc-Gln(Trt)-OH/PyBOP,  
Fmoc-Glu(OtBu)-OH/PyBOP, Fmoc-Gly-OH/PyBOP, Fmoc-His(Trt)-OH/PyBOP,  
Fmoc-Ile-OH/PyBOP, Fmoc-Leu-OH/PyBOP, Fmoc-Lys(Boc)-OH/PyBOP,  
Fmoc-Met-OH/PyBOP, Fmoc-Phe-OH/PyBOP, Fmoc-Pro-OH/PyBOP,  
Fmoc-Ser(tBu)-OH/PyBOP, Fmoc-Thr(tBu)-OH/PyBOP, Fmoc-Trp-OH/PyBOP,  
Fmoc-Tyr(tBu)-OH/PyBOP, Fmoc-Val-OH/PyBOP.

【0056】なお、上記説明において使用されている略語の意味は以下の通りである：

Trt = トリチル；

Pmc = 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル；

Boc = *t*-ブトキシカルボニル；

tBu = *tert*-ブチル；

PyBOP = ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス(ピロリジノ)ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート；

OtBu = *tert*-ブトキシ。

【0057】一連のペプチド鎖の伸長を終了した後、合成し得られた保護ペプチド樹脂：Fmoc-Lys(Boc)-His(Trt)-Val-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Leu-Arg(Pmc)-Glu(OtBu)-Leu-Ala-Arg(Pmc)-Trp-レジン樹脂に、デプロテクション溶液を5分間、3分間と2回反応させて、N末端Fmoc基を脱保護した。

【0058】次いで、DMFにて5回洗浄後、メタノールで2回、*t*-ブチルメチルエーテルにて1回洗浄し、

Trp-His-Asn-Trp-Thr-Trp-Thr-Gly-Leu-Pro-Gly-Gln (II)

Gly-His-Trp-Thr-Ala-Ser-Thr-Asn-Tyr-Val-Arg-Pro (III)

Gln-Thr-Thr-His-Trp-Asp-Ser-Ala-Lys-Tyr-Pro-Ala (IV)

Phe-His-Glu-Asn-Trp-Pro-Ser (V)

Phe-His-Trp-Trp-Tyr-Thr-Ile (VI)

Phe-Pro-Ala-His-Ala-Ser-Arg (VII)

Tyr-Ser-Phe-Glu-Arg-Ser-Lys (VIII)

#### 【0061】結合性の確認

合成したペプチド(I)をリン酸バッファー(pH8.0)に1 mg/mlの濃度になるように溶解した。フルオレセイン イソチオシアネート(FITC)を、ペプチド(I)に対してモル比で8倍になるように添加し、室温で40分間反応させた。標識反応は、反応溶液をセファデックスG-25(予め50mMのリン酸バッファー(pH7.5)で平衡化した)カラムに素早くロードすることによって終結させた。FITC標識された溶出画分を分取し、CM-52カラム(予め10mMのリン酸バッファー(pH7.5)で平衡化した)にアプライし、10~150mMのリン酸ナトリウムバッファー(pH7.5)の直線グラジエントで溶出し、様々なFITC標識されたペプチドを分取した。分取した各画分について、280nmにおける吸光度からペプチド量を定量し、494nm吸光度から導入されたFITC量を定量した。ペプチドに対して1:1のモル比でFITC標識されたペプチド・フラクションを調製した。

【0062】ホタル由来のルシフェラーゼ(シグマ社製)を100mM 炭酸ナトリウム(pH8.6)に0.1 mg/mlになるように溶解させ、マイクロ試験ウエルに0.1 ml添加し、4℃で12時間放置することによって、ルシフェラーゼをウエル上に固定化した。ルシフェラーゼ溶液を棄て、代わりに5 mg/ml ウシ血清アルブミン(シグマ社製)、0.02%アジ化ナトリウムを含む100mM 炭酸ナトリウム(pH8.6)(ブロッキング・バッファー)を加え、

さらに窒素ガスを吹き付けて、10分間、残余する溶媒の除去、乾燥させた。

【0059】以上の処理を施した後、反応室より得られた保護ペプチド樹脂を取り出し、クリベージ溶液(9400mlのトリフロロ酢酸、300mlのチオアニソールおよび300mlのエタンジチオールを混合し、5mgの2-メチルインドールを溶解したもの)を0.5ml加え、室温で2時間反応させることにより、レジン樹脂からのペプチド鎖の切断(分離)およびアミノ酸側鎖保護基の除去を行い、ペプチド溶液を得た。このペプチド溶液に、10mlの冷エーテルを加え、含有しているペプチドを沈殿させた。これを遠心して(2000×g、10分間)沈殿物を集め、再び冷エーテルを加えて分散させ、遠心して回収する操作を、4回繰り返して、ペプチドを洗浄した。得られたペプチドを凍結乾燥させ、目的とするペプチド(I)を得た。

【0060】同様に、以下の7種類のアミノ配列のペプチド(II)~(VIII)を合成した。

室温で1時間ブロッキングした。ブロッキング・バッファーを棄て、代わりに0.5%Tween-20、150mM 塩化ナトリウムを含むトリス-塩酸バッファー(pH7.5)(TBSTバッファー)を加え、ウエルを良く洗浄した。

【0063】このルシフェラーゼを固定化したマイクロ試験ウエルに、上記FITC標識ペプチドを各種濃度になるように添加した。室温で1時間放置後、ルシフェラーゼとの結合により、ウエル上に吸着された標識ペプチド量をFITCの蛍光スペクトルから定量した。

【0064】吸着された標識ペプチドの量に対して、吸着/未吸着の標識ペプチド量の比をプロット(Scatchard plot)すると、直線関係が得られ、その傾きから結合定数 $10^{10}$  [1/mol]を求めることができた。

【0065】同様に、残る7種のペプチド(II)~(VIII)に関しても、FITC標識し、ルシフェラーゼを固定化したマイクロ試験ウエルを用いて、それぞれ結合定数の測定をしたところ、ペプチド(I)と同程度の結合定数が得られた。以下に、その結合定数を併せて示す。

【0066】

【表1】

ペプチド	結合定数 [1/mol]
(II)	$\sim 10^{10}$
(III)	$\sim 10^{10}$
(IV)	$\sim 10^{10}$
(V)	$\sim 10^9$
(VI)	$\sim 10^9$
(VII)	$\sim 10^9$
(VIII)	$\sim 10^9$

【0067】(実施例2) 合成したアミノ酸配列(I)～(VIII)をそれぞれ有する8種類のペプチドを利用して、ルシフェラーゼを高い定量性で検出できることを検証した。

【0068】蛍光標識ルシフェラーゼの調製  
 ホタル由来のルシフェラーゼ(シグマ社製)をリン酸バッファー(pH8.0)に1 mg/mlの濃度に成るように溶解した。フルオレセイン イソチオシアネート(FITC)を、ルシフェラーゼに対してモル比で8倍になるように添加し、室温で40分間反応させた。標識反応は、反応溶液をセファデックスG-25(予め50mMのリン酸バッファー(pH7.5)で平衡化した)カラムに素早くロードすることによって終結させた。FITC標識された溶出画分を分取し、CM-52カラム(予め10mMのリン酸バッファー(pH7.5)で平衡化した)にアプライし、10～150mMのリン酸ナトリウムバッファー(pH7.5)の直線グラジエントで溶出し、様々なFITC標識されたルシフェラーゼ画分を分取した。各画分について、280nmにおける吸光度からルシフェラーゼ量を定量し、494nm吸光度から導入されたFITC量を定量した。ルシフェラーゼに対して、1:1のモル比でFITC標識されたルシフェラーゼ画分を調製した。

【0069】競合法によるルシフェラーゼの測定  
 合成ペプチド(I)を100mM 炭酸ナトリウム(pH8.6)に100 pmol/mlになるように溶解させ、マイクロ試験ウェルに0.1 ml添加し、4℃で12時間放置することによって、ペプチド(I)をウェル上に固定化した。ペプチド(I)溶液を棄て、代わりに5 mg/ml ウシ血清アルブミン(シグマ社製)、0.02%アジ化ナトリウムを含む100mM 炭酸ナトリウム(pH8.6)(ブロッキング・バッファー)を加え、室温で1時間ブロッキングした。ブロッキング・バッファーを棄て、代わりに0.5%Tween-20、150mM 塩化ナトリウムを含むトリス-塩酸バッファー(pH7.5)(TBSTバッファー)を加え、ウェルを良く洗浄した。

#### SEQUENCE LISTING

<110>; CANON INC.

<120>; Peptide Having Binding Affinity to Luciferase

<130>; 4278196

<160>; 8

<170>; Microsoft Word

<210>; 1

<211>; 12

【0070】ペプチド(I)を固定化したマイクロ試験ウェルに、上記FITC標識ルシフェラーゼの一定量1 pmolと、標識していないルシフェラーゼの0.1～10 pmolとを添加した。室温で1時間放置後、ルシフェラーゼ溶液を取り出し、ウェルをTBSTバッファーで良く洗浄し、ペプチド(I)との結合により、ウェル上に吸着された標識ルシフェラーゼをFITCの蛍光量から定量した。

【0071】投入した標識していないルシフェラーゼ量に対して、吸着された標識ルシフェラーゼの量をプロットすることによって、検量線を作成した。図1に、作成された検量線の一例を示す。図1のプロットにおける縦軸の蛍光強度は、10 pmolのペプチド(I)に対して、非標識ルシフェラーゼを加えずに標識ルシフェラーゼのみ1 pmolを添加し、結合させた際に、観測される蛍光強度を1としたときの相対値である。このような検量線を利用することによって、試料中に含まれる0.1～10 pmolの非標識ルシフェラーゼを定量することができた。

【0072】同様にして、残る7種のペプチド(II)～(VIII)に関しても、各ペプチドをマイクロ試験ウェルに固定化し、FITC標識したルシフェラーゼを用いて、標識されていないルシフェラーゼの競合法による定量試験を行ったところ、ペプチド(II)～(VIII)のいずれについても、試料中に含まれる0.1～10 pmolのルシフェラーゼを定量することができた。

#### 【0073】

【発明の効果】本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドは、ルシフェラーゼに対する特異的な結合性を示すアミノ酸長が12以下のアミノ酸配列を含むペプチドであり、かかるペプチドは、そのペプチド鎖に標識物質を付加して、標識プローブとすること、また、然るべき支持体上に担持・固定することが容易にできる。これらの特徴を利用して、例えば、ルシフェラーゼを含む試料と接触させれば、試料中のルシフェラーゼをかかるペプチドとの結合を介して、所定の支持体近傍に捕捉することができる。従って、標識物質を備えた既知濃度のルシフェラーゼとの競合反応などの利用により、生物学的試料におけるインビトロでのルシフェラーゼを検出、さらには、定量することが可能となる。

#### 【0074】

##### 【配列表】

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Luciferase

&lt;;400&gt;; 1

Lys His Val Asn Glu Leu Arg Glu Leu Ala Arg Trp

1

5

10

&lt;;210&gt;; 2

&lt;;211&gt;; 12

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Luciferase

&lt;;400&gt;; 2

Trp His Asn Trp Thr Trp Thr Gly Leu Pro Gly Gln

1

5

10

&lt;;210&gt;; 3

&lt;;211&gt;; 12

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Luciferase

&lt;;400&gt;; 3

Gly His Trp Thr Ala Ser Thr Asn Tyr Val Arg Pro

1

5

10

&lt;;210&gt;; 4

&lt;;211&gt;; 12

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Luciferase

&lt;;400&gt;; 4

Gln Thr Thr His Trp Asp Ser Ala Lys Tyr Pro Ala

1

5

10

&lt;;210&gt;; 5

&lt;;211&gt;; 7

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Luciferase

&lt;;400&gt;; 5

Phe His Glu Asn Trp Pro Ser

1

5

&lt;;210&gt;; 6

<;211>; 7  
<;212>; PRT  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Lucifera  
se  
<;400>; 6  
Phe His Trp Trp Tyr Thr Ile  
1 5  
<;210>; 7  
<;211>; 7  
<;212>; PRT  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Lucifera  
se  
<;400>; 7  
Phe Pro Ala His Ala Ser Arg  
1 5  
<;210>; 8  
<;211>; 7  
<;212>; PRT  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Selected peptide fragment based on affinity of binding to Lucifera  
se  
<;400>; 8  
Tyr Ser Phe Glu Arg Ser Lys  
1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のルシフェラーゼ結合性ペプチドによる

結合・固定を利用した競合法によるルシフェラーゼの定  
量に用いる定量曲線の一例である。

【図1】

競合法による定量曲線

蛍光強度(相対値)

